研究用

TaKaRa

PrimerArray® Analysis Tool Ver.2.2

説明書

v201212

PrimerArray Analysis Tool Ver.2.2 は、PrimerArray（製品コード PH001 ～ PH015、PN001 ～ PN015）で得られたデータを解析するためのツールで、コントロールサンプルと 1 種類の未知サンプル間の比較が可能です。リアルタイム PCR 装置付属のソフトウェアで算出された Ct 値を用いて ΔΔCt 法による相対定量解析を行い、結果をグラフで表示します。

＊ PrimerArray Analysis Tool Ver.2.2 は、Microsoft® Office Excel® で作成されたマクロを含むファイルです。このファイルは、以下のバージョンのオペレーションシステム（OS）および Microsoft® Office Excel® で正常に動作することを確認しています。
Windows® XP operating system
Microsoft® Office Excel® 2003
Microsoft® Office Excel® 2007

＊ 本解析ツールは、タカラバイオウェブサイトからダウンロードしてご利用ください。
http://www.takara-bio.co.jp/primerarray_tool/

I. Ct 値の算出と出力

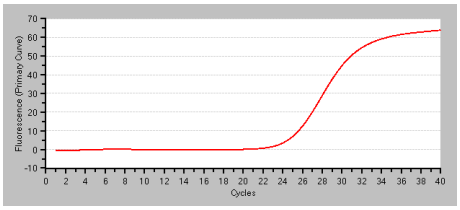
リアルタイム PCR 装置付属のソフトウェアで解析パラメーターを設定し、Ct 値を算出します。（操作方法の詳細は、各リアルタイム PCR 解析ソフトウェアの取扱説明書をご参照ください。）

（1）解析パラメーターの設定

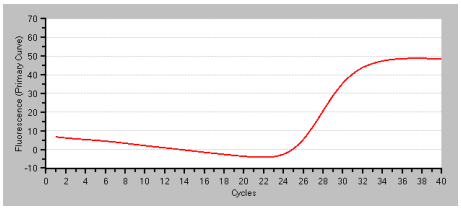
ほとんどのリアルタイム PCR 解析ソフトウェアでは解析パラメーターが自動で設定されますが、まず、その設定が正しいことを確認し、適切でない場合にはマニュアルで設定し直してください。

ベースライン領域

増幅曲線が立ち上る手前のフラットな範囲をベースライン領域として設定します。ベースライン領域が狭すぎる場合、十分なベースライン補正がなされません。逆に、ベースライン領域が広すぎると右下がりの増幅曲線になるなど、正しく補正されないことがあります。



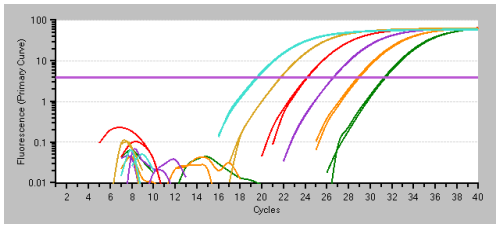
正しくベースラインが設定された例



ベースライン領域が広すぎる例

Threshold（閾値）

PCR の指数関数的増幅域に設定します。増幅曲線の縦軸を対数（Log scale）で表示した際に増幅曲線が直線になる範囲が指数関数的増幅域に相当します。



正しく Threshold（閾値）が設定された例

（2）Ct 値の算出

Ct 値はリアルタイム PCR 解析ソフトウェアにより自動的に算出されます。

（3）データの出力

Ct 値を Microsoft® Office Excel® または CSV などの形式で出力します（出力形式はリアルタイム PCR 解析ソフトウェアによって異なります）。

※ リアルタイム PCR 解析ソフトウェアによっては、サンプル情報が設定されていないウェルや解析から除外（Omit）したウェルのデータ行は出力されないことがあります。そのような状態では、PrimerArray Analysis Tool Ver.2.2 へのデータ入力の際に誤りが生じやすくなりますので、全ウェルのデータが表示される状態で出力を行ってください。

II. 相対定量解析

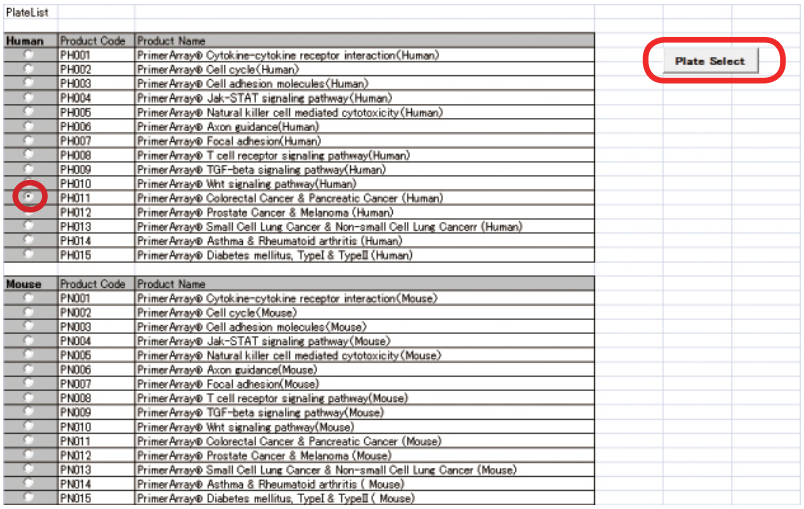
PrimerArray Analysis Tool Ver.2.2 を用いてΔΔCt 法による相対定量解析を行います。

（1）PrimerArray Analysis Tool Ver.2.2 の起動

PrimerArray Analysis Tool Ver.2.2 のファイル（PrimerArray Analysis Tool Ver.2.2.xls）を開きます。

（2）Plate の選択

実験に用いた PrimerArray の種類を選択し、Plate Select ボタンをクリックします。

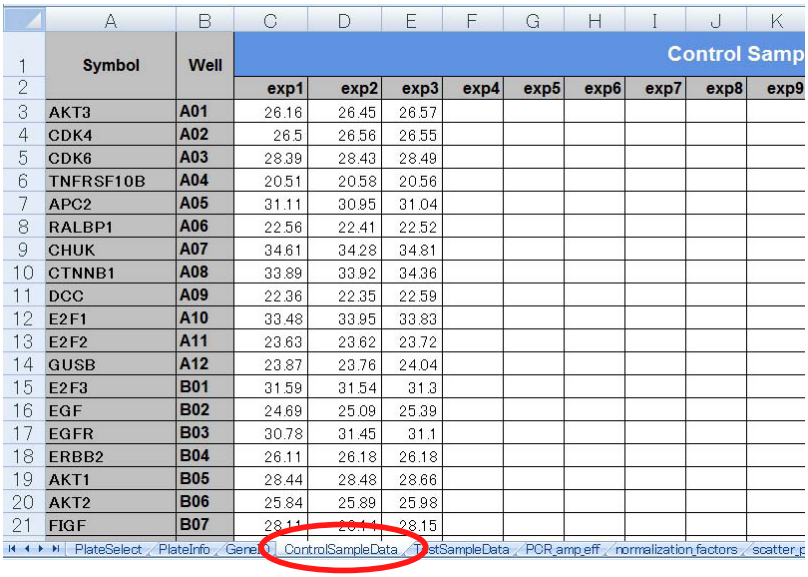


Human	Product Code	Product Name
	PH001	PrimerArray® Cytokine-cytokine receptor interaction(Human)
	PH002	PrimerArray® Cell cycle(Human)
	PH003	PrimerArray® Cell adhesion molecules(Human)
	PH004	PrimerArray® Jak-STAT signaling pathway(Human)
	PH005	PrimerArray® Natural killer cell mediated cytotoxicity(Human)
	PH006	PrimerArray® Axon guidance(Human)
	PH007	PrimerArray® Focal adhesion(Human)
	PH008	PrimerArray® T cell receptor signaling pathway(Human)
	PH009	PrimerArray® TGF-beta signaling pathway(Human)
	PH010	PrimerArray® Wnt signaling pathway(Human)
	PH011	PrimerArray® Colorectal Cancer & Pancreatic Cancer (Human)
	PH012	PrimerArray® Prostate Cancer & Melanoma (Human)
	PH013	PrimerArray® Small Cell Lung Cancer & Non-small Cell Lung Cancerr (Human)
	PH014	PrimerArray® Asthma & Rheumatoid arthritis (Human)
	PH015	PrimerArray® Diabetes mellitus, TypeI & TypeII (Human)

Mouse	Product Code	Product Name
	PN001	PrimerArray® Cytokine-cytokine receptor interaction(Mouse)
	PN002	PrimerArray® Cell cycle(Mouse)
	PN003	PrimerArray® Cell adhesion molecules(Mouse)
	PN004	PrimerArray® Jak-STAT signaling pathway(Mouse)
	PN005	PrimerArray® Natural killer cell mediated cytotoxicity(Mouse)
	PN006	PrimerArray® Axon guidance(Mouse)
	PN007	PrimerArray® Focal adhesion(Mouse)
	PN008	PrimerArray® T cell receptor signaling pathway(Mouse)
	PN009	PrimerArray® TGF-beta signaling pathway(Mouse)
	PN010	PrimerArray® Wnt signaling pathway(Mouse)
	PN011	PrimerArray® Colorectal Cancer & Pancreatic Cancer (Mouse)
	PN012	PrimerArray® Prostate Cancer & Melanoma (Mouse)
	PN013	PrimerArray® Small Cell Lung Cancer & Non-small Cell Lung Cancer (Mouse)
	PN014	PrimerArray® Asthma & Rheumatoid arthritis (Mouse)
	PN015	PrimerArray® Diabetes mellitus, TypeI & TypeII (Mouse)

（3）Control Sample データの入力

Plate Select ボタンをクリックすると、Control Sample のデータを入力するシート（ControlSampleData）に変わります。exp1（C 列）、exp2（D 列）、exp3（E 列）・・・の順に Ct 値を入力します（リアルタイム PCR 解析ソフトウェアから出力した Ct 値をコピー＆ペーストすると簡単に入力できます）。反復実験の結果は、最大 10 個まで入力することができます。



	A	B	C	D	E	F	G	H	I	J	K
1	Symbol	Well	Control Samp								
2			exp1	exp2	exp3	exp4	exp5	exp6	exp7	exp8	exp9
3	AKT3	A01	26.16	26.45	26.57						
4	CDK4	A02	26.5	26.56	26.55						
5	CDK6	A03	28.39	28.43	28.49						
6	TNFRSF10B	A04	20.51	20.58	20.56						
7	APC2	A05	31.11	30.95	31.04						
8	RALBP1	A06	22.56	22.41	22.52						
9	CHUK	A07	34.61	34.28	34.81						
10	CTNNB1	A08	33.89	33.92	34.36						
11	DCC	A09	22.36	22.35	22.59						
12	E2F1	A10	33.48	33.95	33.83						
13	E2F2	A11	23.63	23.62	23.72						
14	GUSB	A12	23.87	23.76	24.04						
15	E2F3	B01	31.59	31.54	31.3						
16	EGF	B02	24.69	25.09	25.39						
17	EGFR	B03	30.78	31.45	31.1						
18	ERBB2	B04	26.11	26.18	26.18						
19	AKT1	B05	28.44	28.48	28.66						
20	AKT2	B06	25.84	25.89	25.98						
21	FIGF	B07	28.11	28.14	28.15						

PlateSelect / PlateInfo / Gene / ControlSampleData / TestSampleData / PCR_amp.eff / normalization_factors / scatter_p

（4）Test Sample データの入力

次に、Test Sample 入力用のシート（TestSampleData）を選択します。Control Sample と同じ要領で Ct 値を入力します。入力が完了したら set sample data ボタンをクリックします。

データのクリア

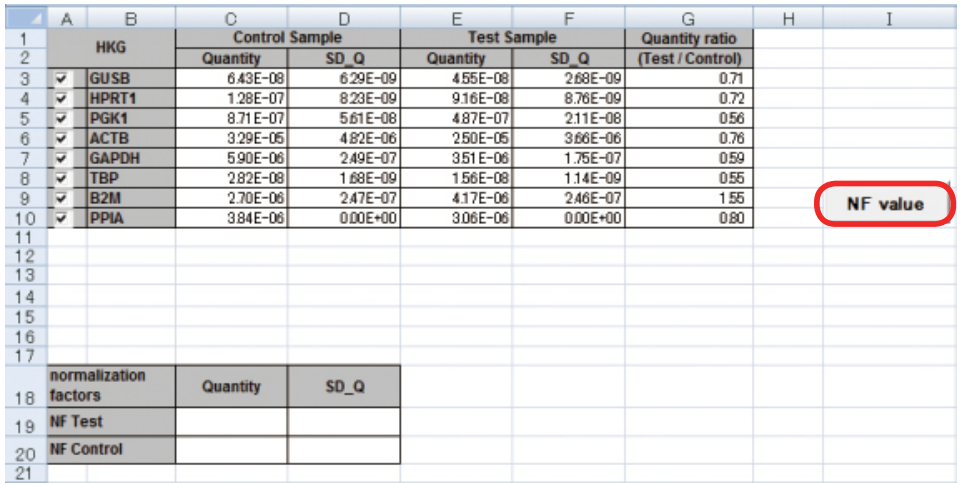
データ入力をやり直す場合には clear ボタンをクリックします。すると、入力したすべてのデータが消去されます。

Ct 値の cutoff 値の設定

Ct 値の cutoff 値を設定すると、一定以上の Ct 値のデータを解析から除外することができます。デフォルトでは 35 サイクルに設定されており、Ct 値が 35 以上のデータは解析から除外されます。cutoff 値を変更する場合には、この Ct cutoff value の値を変更します。

（5）Normalization Factor の算出

set sample data ボタンをクリックすると、Normalization Factor 算出のシート（normalization_factors）に変わります。補正に用いるハウスキーピング遺伝子（HKG）＊1 をチェックボックスで選択し、NF value ボタンをクリックします。すると、Normalization Factor が算出され、自動的に相対定量解析が行われます。



	HKG	Control Sample		Test Sample		Quantity ratio
		Quantity	SD_Q	Quantity	SD_Q	(Test / Control)
☑	GUSB	6.43E-08	6.29E-09	4.55E-08	2.68E-09	0.71
☑	HPRT1	1.28E-07	8.23E-09	9.16E-08	8.76E-09	0.72
☑	PGK1	8.71E-07	5.61E-08	4.87E-07	2.11E-08	0.56
☑	ACTB	3.29E-05	4.82E-06	2.50E-05	3.66E-06	0.76
☑	GAPDH	5.90E-06	2.49E-07	3.51E-06	1.75E-07	0.59
☑	TBP	2.82E-08	1.68E-09	1.56E-08	1.14E-09	0.55
☑	B2M	2.70E-06	2.47E-07	4.17E-06	2.46E-07	1.55
☑	PPIA	3.84E-06	0.00E+00	3.06E-06	0.00E+00	0.80

NF value

normalization factors	Quantity	SD_Q
NF Test		
NF Control		

＊1：ハウスキーピング遺伝子の選択について

Normalization Factor は反応に用いた鋳型量を補正するための係数で、サンプル間で発現量が安定しているハウスキーピング遺伝子（HKG）を指標として算出します。サンプル間で発現量が異なるハウスキーピング遺伝子を補正に用いると結果が不正確になりますので、その選択には注意が必要です。適切なハウスキーピング遺伝子を選択するには、実験的に確かめるか＊、既知の情報（生物学的知見、文献情報、マイクロアレイの解析結果等）を利用します。そのような情報も得られない場合には、全種類のハウスキーピング遺伝子をリファレンスとして用いるか、RNA 量の補正を行わずに（全種類を非選択とする）解析を行います。

＊ 参考

・Housekeeping Gene Primer Set（製品コード 3790/3791/3792）説明書
・geNorm manual
http://medgen.ugent.be/~jvdesomp/genorm/geNorm_manual.pdf
・Accurate normalization of real-time quantitative RT-PCR data by geometric averaging of multiple internal control genes. Vandesompele J, De Preter K, Pattyn F, Poppe B, Van Roy N, De Paepe A, Speleman F. *Genome Biol*. 2002 Jun 18;3 (7): RESEARCH0034. Epub 2002 Jun 18.

（6）解析結果の確認

解析後、Fold Difference の 3D profile が表示されます。その他の結果を見るには、各シートを選択します。

Fold Difference

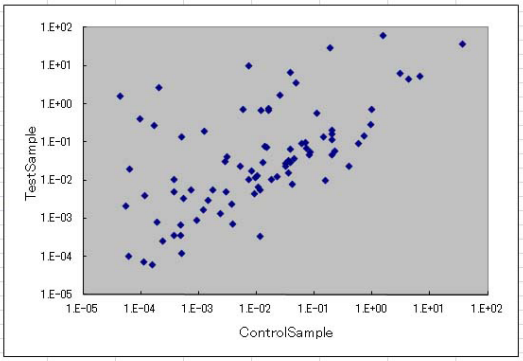
Control Sample を 1 とした場合の Test Sample の相対定量値および標準偏差の一覧です。

	A	B	C	D	E	F
1	Fold Difference					
2			expression level		SD	
3	Well	Symbol	Test Sample	Contorol Sample	Test Sample	Control Sample
4	A01	AKT3	2.31E+00	1.00E+00	4.08E−01	1.49E−01
5	A02	CDK4	3.08E−02	1.00E+00	3.11E−03	3.64E−02
6	A03	CDK6	1.36E+01	1.00E+00	8.42E−01	4.52E−02
7	A04	TNFRSF10B	2.09E−01	1.00E+00	1.56E−02	3.81E−02
8	A05	APC2	2.76E+02	1.00E+00	1.38E+01	6.26E−02
9	A06	RALBP1	1.61E+02	1.00E+00	7.54E+00	6.11E−02
10	A07	CHUK	3.66E+04	1.00E+00	1.56E+03	1.88E−01
11	A08	CTNNB1	3.22E+02	1.00E+00	4.66E+01	1.85E−01
12	A09	DCC	6.07E−01	1.00E+00	5.73E−02	9.84E−02
13	A10	E2F1		1.00E+00		1.72E−01
14	A11	E2F2	6.51E−01	1.00E+00	6.98E−02	4.78E−02
15	A12	GUSB	9.59E−01	1.00E+00	6.23E−02	1.02E−01
16	B01	E2F3	2.86E+01	1.00E+00	9.25E−01	1.11E−01
17	B02	EGF	8.65E−01	1.00E+00	5.70E−02	2.45E−01
18	B03	EGFR	7.63E−01	1.00E+00	3.98E−02	2.34E−01

Scatter plot

左の表は、Control Sample に対して相対化する前の定量値と標準偏差の一覧です。その右には、それらの値が Scatter plot で表示されます。

	A	B	C	D	E	F
1	Scatter Plot					
2			expression level		SD	
3	Well	Symbol	Test Sample	Control Sample	Test Sample	Contorol Sample
4	A01	AKT3	2.94E−02	1.27E−02	5.19E−03	1.89E−03
5	A02	CDK4	3.53E−04	1.15E−02	3.56E−05	4.17E−04
6	A03	CDK6	4.19E−02	3.07E−03	2.59E−03	1.39E−04
7	A04	TNFRSF10E	1.52E−01	7.29E−01	1.14E−02	2.78E−02
8	A05	APC2	1.41E−01	5.10E−04	7.03E−03	3.20E−05
9	A06	RALBP1	3.04E+01	1.89E−01	1.42E+00	1.15E−02
10	A07	CHUK	1.61E+00	4.39E−05	6.84E−02	8.24E−06
11	A08	CTNNB1	2.01E−02	6.25E−05	2.91E−03	1.15E−05
12	A09	DCC	1.20E−01	1.98E−01	1.14E−02	1.95E−02
13	A10	E2F1		7.75E−05		1.33E−05
14	A11	E2F2	5.49E−02	8.44E−02	5.89E−03	4.04E−03
15	A12	GUSB	6.90E−02	7.20E−02	4.48E−03	7.34E−03
16	B01	E2F3	1.07E−02	3.74E−04	3.45E−04	4.16E−05
17	B02	EGF	2.77E−02	3.20E−02	1.82E−03	7.84E−03
18	B03	EGFR	3.68E−04	4.83E−04	1.92E−05	1.13E−04
19	B04	ERBB2	7.66E−02	1.49E−02	3.62E−03	5.99E−04
20	B05	AKT1	3.20E−02	2.89E−03	1.43E−03	2.49E−04
21	B06	AKT2	1.08E−02	1.79E−02	5.16E−04	1.02E−03
22	B07	FIGF	7.37E−04	3.81E−03	6.47E−05	1.23E−04
23	B08	FOS	1.03E−02	1.54E−01	8.88E−04	1.23E−02
24	B09	PIK3R5	6.53E−02	3.75E−02	5.94E−03	2.91E−03
25	B10	APPL1	2.11E−01	1.98E−01	1.98E−02	1.31E−02
26	B11	GSK3B	5.58E−03	1.15E−02	3.67E−04	6.08E−04
27	B12	HPRT1	1.39E−01	1.43E−01	1.38E−02	1.01E−02
28	C01	MSH6	1.05E−02	7.26E−03	6.88E−04	4.01E−04
29	C02	APC				
30	C03	BIRC5	1.02E−01	6.86E−02	6.68E−03	6.08E−03
31	C04	IKBKB	9.63E−02	5.72E−01	6.03E−03	2.67E−02
32	C05	ARAF	2.31E−02	3.99E−01	2.26E−03	1.82E−02
33	C06	JAK1	1.69E−01	1.97E−01	1.06E−02	6.28E−03

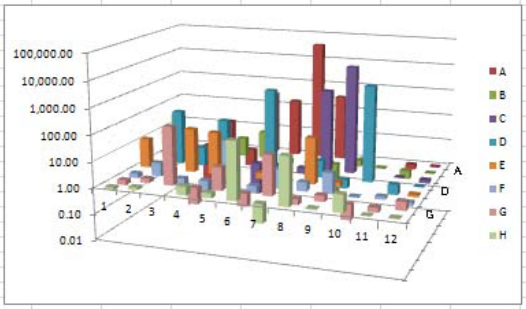


3D Profile

Fold Difference を棒グラフで表示します。グラフの上には Plate と同じ配置で Test Sample の Fold Difference および遺伝子の Symbol の表が表示されます。Fold Difference の表は発現減少（0.5 以下）を青、変化なし（0.5 より大きく 2 未満）を灰色、発現増大（2 以上）を赤としています。

3D Profile	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	2.31E+00	3.08E-02	1.36E+01	2.09E-01	2.76E+02	1.61E+02	3.66E+04	3.22E+02	6.07E-01		6.51E-01	9.59E-01
B	2.86E+01	8.65E-01	7.63E-01	5.13E+00	1.11E+01	6.03E-01	1.93E-01	6.65E-02	1.74E+00	1.06E+00	4.86E-01	9.73E-01
C	1.44E+00		1.48E+00	1.68E-01	5.79E-02	8.59E-01	5.86E-01	1.37E+03	1.33E+04		9.73E-01	7.58E-01
D		1.23E+02	5.24E+00	7.56E+01		1.63E+03		4.38E+00	4.51E-01	4.36E+02	4.03E-01	1.03E+00
E	1.34E+01	3.89E+01	4.82E+01	4.25E+01		1.69E+00	8.59E-01	5.81E+01	1.44E+00			8.07E-01
F	6.60E-01	3.23E+00	4.86E-01	2.48E-01	4.31E+01	5.66E-01	5.62E+00	2.19E+00	6.23E+00	9.27E-01	1.28E+00	7.53E-01
G	6.60E-01	1.44E+00	1.71E+02	2.38E-01	7.73E+00	3.14E-01	2.45E+01	5.99E-01	1.69E+00	2.68E-01	6.60E-01	2.10E+00
H	8.01E-01	1.25E+00		2.16E+00	1.55E+00	1.58E+02	1.92E-01	6.76E+01	1.11E+00	4.63E+00	9.79E-01	1.08E+00

Symbol	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	AKT3	CDK4	CDK6	TNFR SF10B	APC2	RALBP1	CHUK	CTNNB1	DCC	E2F1	E2F2	GUSB
B	E2F3	EGF	EGFR	ERBB2	AKT1	AKT2	FIGF	FOS	PIK3R5	APPL1	GSK3B	HPRT1
C	MSH6	APC	BIRC5	IKBKB	ARAF	JAK1	JUN	KRAS	RHOA	SMAD2	SMAD3	PGK1
D	SMAD4	MLH1	MSH2	MSH3	MYC	NFKB1	LEF1	PGF	PIK3CA	PIK3CG	PIK3R1	ACTB
E	PLD1	CYCS	MAPK1	MAPK8	MAP2K1	BAD	RAC1	RAC2	RAD51	RAF1	RALA	GAPDH
F	RALB	RALGDS	RB1	CCND1	BCL2	RELA	BCL2L1	BRAF	STAT1	STAT3	TCF7	TBP
G	TCF7L2	TGFA	TGFB1	TGFB2	TGFB3	TGFBR1	TGFBR2	TP53	VEGFA	VEGFC	AXIN1	B2M
H	AXIN2	TCF7L1	CASP3	CASP9	PIK3R3	IKBKG	ARHGEF6	CDC42	BRCA2	VEGFB	THBS1	PPIA



KEGG_pathway

Takara Bio Inc. is a authorized service provider of KEGG

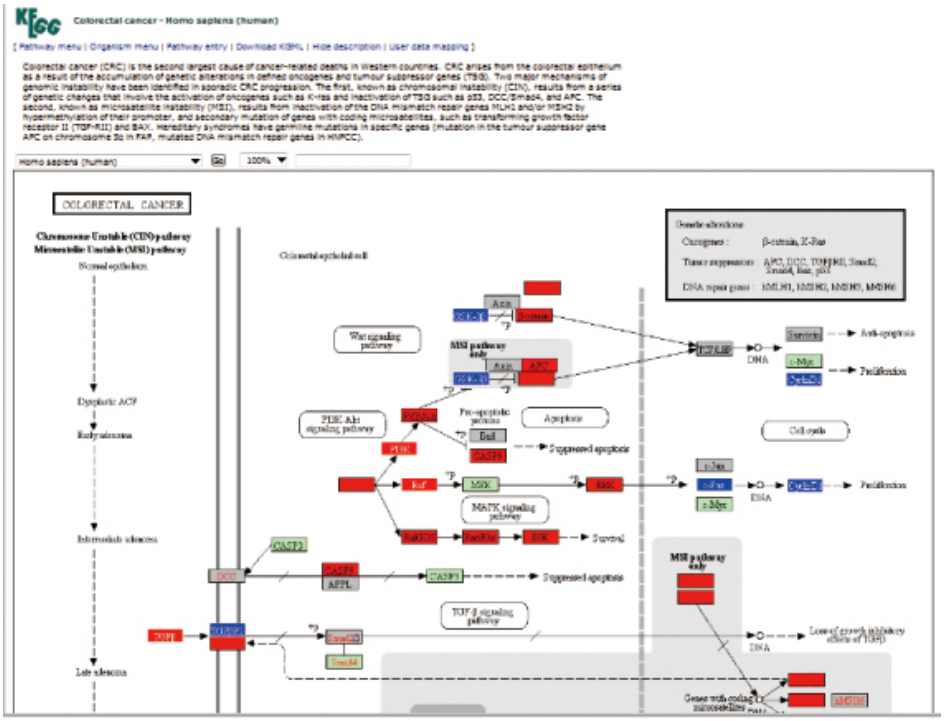
KEGG_pathway ボタンをクリックすると、まず KEGG パスウェイマップ上での発現変動による色分けの凡例が表示されます。さらに、その画面上の “KEGG pathway” のリンクをクリックすると、パスウェイマップが表示され発現増大または減少した遺伝子を確認することができます。

KEGG pathway
hsa05210 : Colorectal cancer
hsa05212 : Pancreatic cancer

Definition of node color when behavior is analyzed

	Relation between behavior and point color of gene	character color	background color	Example
A	Up Gene Point	Black	Red	1,2,3,4
B	Down Gene Point	White	Blue	1,2,3,4
C	No_change Gene Point	Black	Gray	1,2,3,4
A+B*	Up Gene and Down Gene Point	White	Red	1,2,3,4

* Plural GeneID might be included in one node that displayed in map of KEGG pathway



以上で解析は終了です。他のデータの解析を行う場合には、TestSampleData のシートで clear ボタンをクリックしてデータを消去し、（2）Plate の選択から始めてください。

III. トラブルシューティング

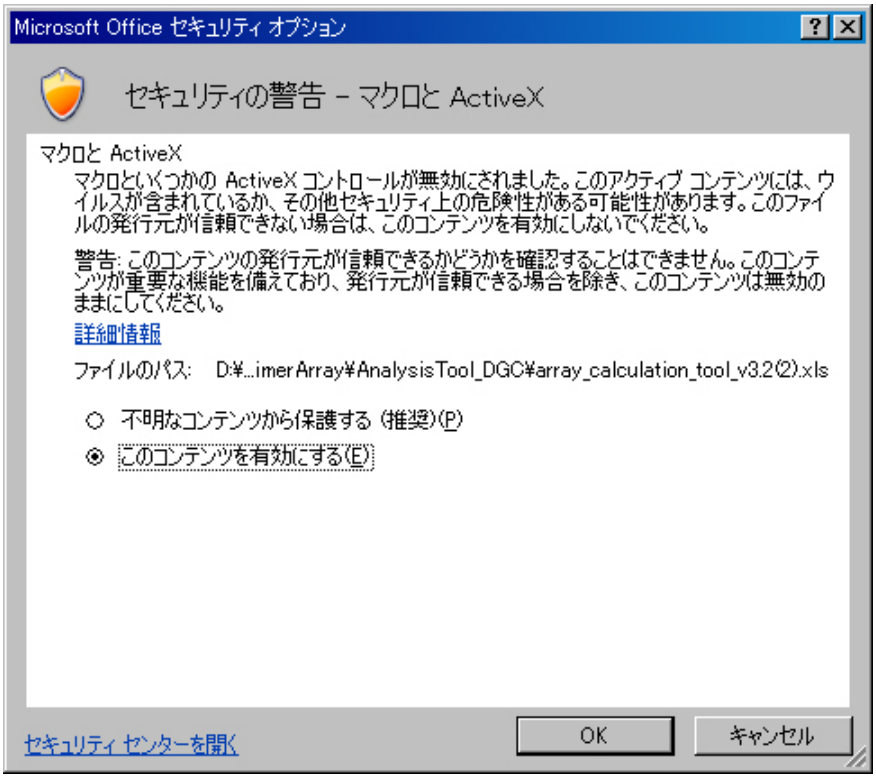
● セキュリティの警告が表示される

PrimerArray Analysis Tool Ver.2.2 はマクロを含んでいるため、セキュリティの警告が表示されることがあります。その場合には、マクロを有効にする操作を行ってください。

Microsoft® Office Excel® 2007 の場合

（1）セキュリティの警告のオプションをクリックする。

（2）「このコンテンツを有効にする」を選択して、OK ボタンをクリックする。



製品についての技術的なお問い合わせ先
TaKaRa テクニカルサポートライン
Tel 077-543-6116　Fax 077-543-1977
ホームページアドレス http://www.takara-bio.co.jp/

タカラバイオ株式会社

v201212